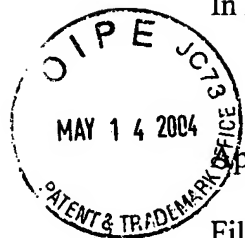


JPW

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: Hirano et al.



Art Unit: 1652

Application No.: 10/784,986

Examiner: [to be assigned]

Filing Date: February 25, 2004

Atty. Docket: US-109

Title: Novel lysine decarboxylase gene and
method for producing L-lysine

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119 IN UTILITY APPLICATION

Commissioner of Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450


Sir:

Priority under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed to the following priority document(s), filed in a foreign country within one (1) year prior to the filing of the above-referenced United States utility patent application (35 U.S.C. § 172):

Country	Priority Document Appl. No.	Filing Date
Japan	2003-47185	February 25, 2003

A certified copy of each listed priority document is submitted herewith. Prompt acknowledgment of this claim and submission is respectfully requested.

Respectfully submitted,



Shelly Guest Cermak
Reg. No. 39,571

Date: May 14, 2004
PTO Customer Number: **000038108**
Ajinomoto Corporate Services, LLC
1120 Connecticut Avenue
Ste. 1010
Washington, D.C. 20036
202.457.0284

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 2 月 2 5 日
Date of Application:

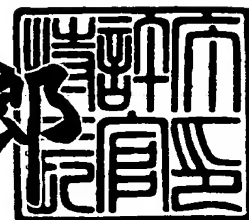
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 4 7 1 8 5
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 4 7 1 8 5]

出 願 人 味の素株式会社
Applicant(s):

2 0 0 3 年 7 月 1 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



【書類名】 特許願

【整理番号】 P-B0650

【提出日】 平成15年 2月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00
C12P 13/06

【発明の名称】 新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子及びL-リジンの製造法

【請求項の数】 7

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

 【氏名】 平野 聖子

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

 【氏名】 安枝 寿

【特許出願人】

 【識別番号】 000000066

 【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100100549

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 川口 嘉之

【選任した代理人】

 【識別番号】 100090516

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 192372

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子及びL-リジンの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記(A)又は(B)に示すタンパク質。

(A) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、リジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項2】 下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNA

。

(A) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、リジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項3】 下記(a)又は(b)に示すDNAである請求項2に記載のDNA。

(a) 配列番号3に記載の塩基配列の塩基番号684～2930からなる塩基配列を有するDNA。

(b) 配列番号3に記載の塩基配列の塩基番号684～2930からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、リジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項4】 メチロフィラス属細菌の染色体に由来することを特徴とする請求項2又は3に記載のDNA。

【請求項5】 L-リジン生産能を有し、かつ、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下または消失するように改変されたメチロフィラス属細菌。

【請求項6】 染色体上の遺伝子であって、かつ、請求項2～4のいずれか一項に記載のDNAと同一の塩基配列を有する遺伝子、又は同DNAと相同組換えが起こり得る程度の相同性を有する遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられ、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下または消失し

た請求項5に記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項7】 請求項6に記載のメチロフィラス属細菌を、メタノールを主要炭素源とする液体培地に培養し、培養物中にL-リジンを生成蓄積させ、該培養物からL-リジンを採取することを特徴とするL-リジンの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、L-リジンの分解に関与するメチロフィラス属細菌の新規リジンデカルボキシラーゼ遺伝子、当該遺伝子の発現が抑えられたメチロフィラス属細菌及び当該細菌を用いたL-リジンの製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

L-リジンの分解酵素として、L-リジンの脱炭酸によりカダベリンを生成する反応を触媒するリジンデカルボキシラーゼ（リジン脱炭酸酵素）が知られている。例えば、エシェリヒア・コリ（*E. coli*）では、CadAとLdcと名づけられた2つの酵素がある（特許文献1）。更には、バチラス・ハロジュランス（*Bacillus halodulans*）、バチラス・サチラス（*Bacillus subtilis*）、ビブリオ・コレラ（*Vibrio cholerae*）、サルモネラ・ティフィムリウム（*Salmonella typhimurium*）、セレンオモナス・ルミナンチウム（*Selenomonas ruminantium*）、ニコチアナ・グルチノーサ（*Nicotiana glutinosa*）などの細菌において、ゲノム上の遺伝子配列情報からや、あるいは実験的結果に基づき、その酵素があることが示唆されている（非特許文献1～3）。しかしながら、メタノール資化性菌において、そのような酵素の存在は定かではない。

【0003】

一方、メチロフィラス属細菌を用いたL-リジンの製造方法として、リジンアナログ、例えば、AEC（S-(2-アミノエチル)-L-システイン）に耐性な変異株、またはL-リジンの生合成に関与する遺伝情報を担うデオキシリボ核酸を組み込んだベクターを保有する組換え体を培養する方法が知られている（特許文献2）。しかしながら、メチロフィラス属細菌ではリジンデカルボキシラーゼをコードす

る遺伝子は知られておらず、同遺伝子の発現が抑えられた、あるいは欠損させたメチロフィラス属細菌を用いたL-リジン生産についての報告もない。

【0004】

【特許文献1】

国際公開第96/17930号パンフレット

【特許文献2】

国際公開第00/61723号パンフレット

【非特許文献1】

KEGG データベース (Release 25.0, January 2003)

【非特許文献2】

Y. Takatsuka, et al., "Journal of Bacteriology", (2000) vol.182, p.6732-6741

【非特許文献3】

Y.-S.Lee and Y.-D. Cho, "The Biochemical Journal", (2001) vol.360, p.657-665

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、メタノール資化性細菌であるメチロフィラス・メチロトロファスのリジンデカルボキシラーゼ遺伝子を取得し、この遺伝子を利用して、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現が抑えられたメチロフィラス属に属するL-リジン生産菌を造成し、また、これらメチロフィラス属細菌を培養することによるL-リジン製造法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、メチロフィラス属細菌にリジンデカルボキシラーゼが存在しているか否かにつき鋭意研究を行った結果、メチロフィラス・メチロトロファスのゲノム上のDNA配列から、他の微生物由来である既知のリジンデカルボキシラーゼ遺伝子とやや相同性のあるオープンリーディングフレーム（以下、「orf」と略する）を発見した。そのアミノ酸配列の相同性としては、例えば、エシェリヒ

ア・コリのcadA産物 (E. coli K12 NCBI:ACC77092) との相同性 (同一アミノ酸となる割合) は38.18%、またldcC産物 (E. coli K12 NCBI:ACC73297) との相同性は37.85%であった。また、このorfのアミノ酸配列は、エシェリヒア・コリのadiAの遺伝子産物 (E. coli K12 NCBI:ACC77078) であるアルギニンデカルボキシラーゼにも約38.11%の相同性を有しており、その実体は不明であった。

【0007】

そこで、メチロフィラス・メチロトロファスの当該orfを破壊したところ、通常、メチロフィラス・メチロトロファスの野生株が生育するSEII培地には生育しなくなった。これは意外なことで、エシェリヒア・コリなどでは、cadA及びldcCを欠損させても、特別な栄養要求性を示さない。

【0008】

メチロフィラス・メチロトロファスの場合は、当該orfの欠損により、SEII培地成分では不足している栄養分があると考えられたため、培地へL-リジンの分解産物であるカダベリン又はL-アルギニンの分解産物であるアグマチンを適量添加したところ、その欠損株は生育可能となった。

【0009】

従って、メチロフィラス・メチロトロファスでは当該orfにコードされるタンパク質は、通常の最少培地に生育するためには必須であること、そして、そのorfの欠損株の生育にはカダベリン又はアグマチンが必要であることが判明した。このことから、このorfを含む遺伝子を、ldc遺伝子と命名した。

【0010】

そして、メチロフィラス・メチロトロファスから育種したL-リジン生産菌において、ldc遺伝子の発現を抑えたところ、生成されるL-リジンの生産量が向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、以下のとおりである。

【0011】

(1) 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質。

(A) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸

の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、リジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

(2) 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードする DNA。

(A) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、リジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

(3) 下記 (a) 又は (b) に示す DNA である (2) の DNA。

(a) 配列番号 3 に記載の塩基配列の塩基番号 684～2930 からなる塩基配列を有する DNA。

(b) 配列番号 3 に記載の塩基配列の塩基番号 684～2930 からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、リジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA。

(4) メチロフィラス属細菌の染色体に由来することを特徴とする (2) 又は (3) に記載の DNA。

(5) L-リジン生産能を有し、かつ、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下または消失するように改変されたメチロフィラス属細菌。

(6) 染色体上の遺伝子であって、かつ、(2)～(4)のいずれかに記載の DNA と同一の塩基配列を有する遺伝子、又は同 DNA と相同組換えが起こり得る程度の相同性を有する遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられ、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下または消失した (5) に記載のメチロフィラス属細菌。

(7) (6) に記載のメチロフィラス属細菌を、メタノールを主要炭素源とする液体培地に培養し、培養物中に L-リジンを生成蓄積させ、該培養物から L-リジンを採取することを特徴とする L-リジンの製造方法。

【0012】

【発明の実施の形態】

< 1 > 本発明のリジンデカルボキシラーゼ及びそれをコードする DNA

本発明のリジンデカルボキシラーゼは、下記 (A) 又は (B) に示すタンパク

質である。

(A) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

【0013】

(B) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、リジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【0014】

また、本発明の DNA は、上記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードする DNA である。

【0015】

本発明の DNA (以下、「*ldc*遺伝子」ということがある) は、メチロフィラス属細菌、例えば、メチロフィラス・メチロトロファスの染色体 DNA から単離、取得することができる。メチロフィラス・メチロトロファスの野生株 AS1 株 (NCIMB No. 10515) は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア (National Collection of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Ltd., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom) から入手可能である。そしてこの株の一般的な培養方法は、NCIMB のカタログに記載されているが、また実施例に記載した SEII 培地でも生育させることができる。

【0016】

そしてこの株の一般的な培養方法は、NCIMB のカタログに記載されているが、また実施例に記載した SEII 培地でも生育させることができる。

AS1 株のゲノム DNA は公知の方法により調製できるが、市販のゲノム調製用キットを使用してもよい。

【0017】

本発明の DNA は、本発明によってそれらの塩基配列が明らかになったので、それらの塩基配列に基づいてプライマーを合成し、メチロフィラス属細菌等の細菌の染色体 DNA を鋳型とする PCR (ポリメラーゼ・チェーン・リアクション) により増幅することによって、取得することができる。また、前記塩基配列に

基づいて調製したプローブ、又はPCRにより増幅した部分断片をプローブに用いたコロニーハイブリダイゼーションによっても、本発明のDNAは取得され得る。

【0018】

本発明のDNAのクローニングに用いるゲノムDNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断および連結、形質転換等の方法は、Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Third Edition (2001)に記載されている。

【0019】

上記PCRに用いるプライマーとしては、配列番号1と及び2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。

上記のようにして取得されたメチロフィラス・メチロトロファスのゲノムから単離されたldc遺伝子の塩基配列を配列番号3に示す。また、それによってコードされるリジンデカルボキシラーゼのアミノ酸配列を配列番号4に示す。

【0020】

上記アミノ酸配列を、既知のアミノ酸配列のデータベースを用いて、相同性のある配列を検索したところ、エシェリヒア・コリの2種のリジンデカルボキシラーゼ（遺伝子はそれぞれ、cadAとldcC）およびアルギニンデカルボキシラーゼ（遺伝子はadiA）と、それぞれ38.18%、37.85%、及び38.11%の相同性が認められた。相同性は、比較に用いた領域の全アミノ酸残基数に対する同一アミノ酸残基の個数の割合として算出した。

【0021】

本発明のDNAは、コードされるリジンデカルボキシラーゼの活性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入または付加を含んでいてもよい。ここで、数個とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、例えば、リジンデカルボキシラーゼを構成するアミノ酸配列全体に対して、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の相同性を有し、リジンデカルボキシラー

ゼの活性を有するものであってもよい。具体的には、前記「数個」は、好ましくは2~20個、より好ましくは2~10個である。前記リジンデカルボキシラーゼの活性とは、L-リジンを脱炭酸してカダベリンを生成する反応を触媒する活性をいう。

【0022】

上記のようなリジンデカルボキシラーゼと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば、部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加を含むように配列番号3に示す塩基配列を改変することによって取得することができる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、ldc遺伝子をヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、およびldc遺伝子を保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくはEMS等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

【0023】

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、ldc遺伝子を保持する微生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異(mutant又はvariant)も含まれる。

【0024】

上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現されたリジンデカルボキシラーゼの活性を調べることにより、リジンデカルボキシラーゼと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。また、変異を有するldc遺伝子を保持する細胞から、配列番号3の塩基番号684~2930からなる塩基配列を有するDNA、または同塩基配列から調製され得るプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、リジンデカルボキシラーゼと実質的に同一のタンパク質を、それぞれコードするDNAが得られる。

【0025】

ここでいう「ストリンジェントな条件」とはいわゆる特異的なハイブリッドが

形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【0026】

プローブとしては、ldc遺伝子の一部の配列を用いることもできる。そのようなプローブは、当業者によく知られた方法により、各遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、各遺伝子を含むDNA断片を鋳型とするPCR反応により作製することができる。プローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は50℃、2×SSC、0.1%SDSが挙げられる。

【0027】

なお、リジンデカルボキシラーゼ活性は、例えばY.-S. Lee and Y.-D. Cho, "The Biochemical Journal", (2001) vol.360, p.657-665の方法により測定することができる。

本発明のldc遺伝子は、後述するようにldc遺伝子破壊株の構築に利用することができるに加えて、例えば、本発明のリジンデカルボキシラーゼの製造に利用することができる。すなわち、ldc遺伝子を適当な宿主微生物に導入し、同遺伝子を発現させることにより、リジンデカルボキシラーゼを製造することができる。これは、遺伝子組換え技術を利用した有用タンパク質の製造に用いられる通常の方法と同様にして行うことができる。すなわち、リジンデカルボキシラーゼをコードするDNAを、適当なプロモーターを含むベクターに挿入し、得られる組換えベクターで大腸菌等の宿主を形質転換し、形質転換体を培養して前記遺伝子を発現させればよい。宿主としては、例えば大腸菌、枯草菌、酵母等が挙げられる。また、プロモーターは、用いる宿主で機能するものであればよく、一例としてはlac、trp、tac、trc、recA、T7（新生化学実験講座1、タンパク質、VI合成

及び発現、日本生化学会編、p166、安枝、松井、1992年、東京化学同人刊）、PGK、ADH1、GPD、MF α 1、SUC2、PH05、GAL1、GAL4（新生化学実験講座1、タンパク質、VI合成及び発現、日本生化学会編、p215、酒井ら、1992年、東京化学同人刊）等が挙げられる。

【0028】

宿主微生物からのリジンデカルボキシラーゼの採取は、通常の組換えタンパク質の製造と同様に行うことができる。

【0029】

<2>本発明のメチロフィラス属細菌

本発明の細菌は、L-リジン生産能を有し、かつ、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下または消失するように改変されたメチロフィラス属細菌である。

【0030】

メチロフィラス属細菌としては、メチロフィラス・メチロトロファスが挙げられる。また、本発明において「L-リジン生産能」とは、本発明の細菌を培地で培養したときに、培地中に有意な量のL-リジンを蓄積する能力をいう。

【0031】

細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性の低下又は消失は、例えば、ldc遺伝子の発現を抑えることによって行われる。また、この遺伝子によりコードされるリジンデカルボキシラーゼ酵素の構造を改変して、比活性を低下又は消失させることによって、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性を低下又は消失させることができる。上記のような細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下又は消失したメチロフィラス属細菌は、例えば、メチロフィラス属細菌を紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）もしくはEMS等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、リジンデカルボキシラーゼ活性が低下した変異株を選択する方法が挙げられる。

【0032】

また、本発明の細菌の好ましい態様として、染色体上のldc遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられ、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ

活性が低下または消失したメチロフィラス属細菌が挙げられる。ここでいうldc遺伝子とは、配列番号4に示すアミノ酸配列を有するリジンデカルボキシラーゼをコードする遺伝子、又は同遺伝子と相同組換えが起こり得る程度の相同性を有する遺伝子を含む。前記相同組換えが起こり得る程度の相同性は、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは99%以上である。

【0033】

染色体上のldc遺伝子の破壊は、実施例に示したように、相同性組換えを利用した遺伝子置換による方法(Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press(1972); Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196(1985))によって、行うことができる。相同性組換えは、細菌が一般的に持つ能力であり、メチロフィラス属細菌も、相同組換えによる遺伝子置換が可能なことを、本発明者らは見出している。具体的には、正常な機能を有するリジンデカルボキシラーゼを産生しないように改変したldc遺伝子(欠失型ldc遺伝子)を含むDNAでメチロフィラス属細菌を形質転換し、欠失型ldc遺伝子と染色体上のldc遺伝子との間で組換えを起こさせる。この後、染色体上のプラスミドが組み込まれた部位で再び組換えが起こると、プラスミドが染色体上から抜け落ちる。その際、組換えが起きる位置によって、欠失型遺伝子の方が染色体上に固定され、元の正常な遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちる場合と、正常な遺伝子が染色体上に固定され、欠失型遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちる場合がある。前者のような菌株を選択することにより、染色体上の正常な遺伝子が欠失型遺伝子で置換された菌株を取得することができる。

【0034】

また、メチロフィラス・メチロトロファスにおいては、染色体上の目的遺伝子と相同な遺伝子を、直鎖状DNA断片の形態で導入することにより、細胞内で染色体上の目的遺伝子と導入した直鎖状DNA断片上の相同な遺伝子との間で相同組換えが起こり、遺伝子置換ができることを本発明者らは見い出しており、このような手法も適用可能である。なお、この手法により遺伝子の置換を行った例を、後記実施例に記載している。

【0035】

前記欠失型ldc遺伝子としては、同遺伝子のコーディング領域の中の塩基配列中に1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることによってコードされるタンパク質の比活性が低下又は消失した遺伝子が挙げられる。また、コーディング領域の内部又は末端を欠失させた遺伝子、あるいは、コード領域に、他の配列を挿入した遺伝子等が挙げられる。他の配列としては、カナマイシン耐性遺伝子等のマーカー遺伝子が挙げられる。

【0036】

染色体上のldc遺伝子の発現を低下又は消失させることは、同遺伝子のプロモーター配列中に、1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせ、プロモーター活性を低下させることによって、転写レベルで遺伝子の発現を抑えること (M. Rosenberg and D. Court, Ann. Rev. Genetics 13 (1979) p.319、P. Youderian, S. Bouvier and M. Susskind, Cell 30 (1982) P.843-853参照) によっても行うことができる。

【0037】

また、ldc遺伝子の発現は、同遺伝子のSD配列と開始コドンとの間の領域中に1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることによって、翻訳レベルで抑えることができる (J. J. Dunn, E. Buzash-Pollert and F. W. Studier, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75 (1978) p.2743参照)。

【0038】

上記のようなプロモーターやSD配列と開始コドンとの間の領域の改変は、前記の遺伝子置換と同様にして行うことができる。

遺伝子中に塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせるには、具体的には、部位特異的変異法 (Kramer, W. and Frits, H. J., Methods in Enzymology, 154, 350(1987)) や、次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等の化学薬剤により処理する方法 (Shortle, D. and Nathans, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 270(1978)) が挙げられる。

【0039】

部位特異的変異法は、合成オリゴヌクレオチドを用いる方法であり、任意の限定された塩基対だけに、任意の置換、欠失、挿入、付加または逆位を導入できる手法である。この方法を利用するには、まず、クローン化され、DNA塩基配列が決定されている目的遺伝子を持つプラスミドを変性させて1本鎖を調製する。次に、変異を起こさせたい部分に相補的な合成オリゴヌクレオチドを合成するが、この時合成オリゴヌクレオチドを完全に相補的な配列にせず、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つようにしておく。その後1本鎖DNAと任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つ合成オリゴヌクレオチドをアニールさせ、さらにDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントとT4リガーゼを用いて完全な2本鎖プラスミドを合成し、これをエシェリヒア・コリのコンピテントセルに導入する。このようにして得られた形質転換体の幾つかは、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位が固定された遺伝子を含むプラスミドを持っている。遺伝子に変異を導入し、改変または破壊することができる同様な手法には、リコンビナントPCR法 (PCR Technology, Stockton press(1989)) がある。

【0040】

以上のようにして取得した変異が導入されて改変または破壊された遺伝子を、メチロフィラス属細菌の染色体上の正常な遺伝子と置換することにより、細胞中のldc遺伝子の発現を抑えることができる。

【0041】

リジンデカルボキシラーゼ活性を低下または消失させるメチロフィラス属細菌は、L-リジン生産能を有する細菌である。L-リジン生産能を有するメチロフィラス属細菌、例えばメチロフィラス・メチロトロファス菌株は、L-リジン生産能を有しない株に変異処理を施し、S-(2-アミノエチル)-L-システイン (以下、AECと記す) 等のリジンアナログに対する耐性を付与することにより取得することができる。変異処理の方法としては、エシェリヒア・コリの菌体にNTGやEMS等の化学薬剤による処理、あるいは紫外線、放射線照射等の処理を施す方法がある。このような菌株の具体例としては、メチロフィラス・メチロトロファスAJ13608が挙げられる。本菌株は、メチロフィラス・メチロトロファスAS1

株にAEC耐性を付与することによって育種されたものである。尚、メチロフィラス・メチロトロファスAJ13608は、1999年6月10日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター：郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号FERM P-17416として寄託され、2000年3月31日付にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-7112が付与されている。

【0042】

また、L-リジン生産能を有するメチロフィラス・メチロトロファス菌株は、L-リジンの生合成に関与する遺伝情報を担うDNAを遺伝子組換え技術により導入、増強することによっても育種することができる。導入される遺伝子は、ジヒドロジピコリン酸合成酵素、スクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼ等、L-リジンの生合成経路上の酵素をコードする遺伝子であり、ジヒドロジピコリン酸合成酵素のようにL-リジンによるフィードバック阻害を受ける酵素遺伝子の場合には、かかる阻害が解除された酵素をコードする変異型遺伝子を用いることが望ましい。

【0043】

また、L-リジンの菌体外への排出に関与するタンパク質の活性を強化することによっても、L-リジン生産能を向上させることができる。L-リジンの細胞外への排出に関与するタンパク質としては、lysE遺伝子によってコードされるLysEタンパク質が知られている。尚、本発明者らは、ブレヴィバクテリウム属細菌に由来する野生型lysE遺伝子は、メチロフィラス属細菌中では全く機能しないが、同細菌で機能するような改変が可能であることを確認している。このようなlysEタンパク質の改変体としては、後記実施例に示すlysE24が挙げられる。

【0044】

lysE遺伝子がコードするLysEタンパク質は、6個の疎水性ヘリックス領域を有している。それらの疎水性ヘリックス領域のいくつかは膜貫通領域であると推定される。また、N末端から3番目と4番目の疎水性ヘリックス領域の間の領域は親水性であり、ループ構造をとると推定される。この親水性領域を本願発明においてはループ領域と呼ぶ。ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタムの野生型

lysEの塩基配列及びLysEタンパク質のアミノ酸配列を、配列番号21及び22に示す。同アミノ酸配列において、疎水性ヘリックス領域は、5～20、37～58、67～93、146～168、181～203、211～232に相当する。また、ループ領域は94～145に相当する。

【0045】

本発明者らは、lysE遺伝子はメチロフィラス属細菌においては致死的に働くが、ループ領域を持たない、あるいは実質的に疎水性ヘリックスのみからなるLysEタンパク質の改変体をコードするDNAは、メタノール資化性菌のL-リジンの細胞外への排出を促進することを見い出した。lysE24は、このような野生型LysEタンパク質が持つループ領域を持たない変異型LysEタンパク質、又は実質的に疎水性ヘリックスのみからなる変異型LysEタンパク質をコードする。

【0046】

上記のような変異型lysEとしては、少なくとも一つ又は二つ以上の疎水性ヘリックスを有し、メチロフィラス属細菌に導入したときにL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進するものであれば特に制限されないが、具体的にはN末端から1番目～6番目の疎水性ヘリックスのすべてを有する変異型LysEをコードするDNAが挙げられる。より具体的には、N末端から1番目～3番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4番目～6番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドとをコードするDNAが挙げられる。前記lysE24は、このような1番目～3番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4番目～6番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドとをコードする変異型lysEの一例である。lysE24遺伝子には、3番目の疎水性ヘリックスをコードする領域の下流に終止コドンが変異により導入されているが、この終止コドンよりも下流の領域を欠失させると、lysE24遺伝子を導入したメチロフィラス・メチロトロファスAS1株はL-リジンを培地中に蓄積しないことを、発明者らは確認している。このことから、1番目～3番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4番目～6番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドがそれぞれ別個に翻訳され、メチロフィラス属細菌中で機能しているものと推定される。いずれにしても、lysE24遺伝子をメチロフィラス属細菌に導入すれば、L-リジンの生産量が向上す

る。

【0047】

前記のようなL-リジンの細胞外への排出に関与するタンパク質をコードするDNA、すなわちlysE遺伝子またはその相同遺伝子の供与微生物としては、それらの遺伝子の改変体がメタノール資化性菌中でL-リジン排出活性を発現することができるものを保持する微生物であれば、いかなる微生物でも利用できる。具体的には、コリネバクテリウム・ゲルタミカム、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム等のコリネ型細菌、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌、シュードモナス・アエルジノーサ等のシュードモナス属細菌、マイコバクテリウム・ツベルクロシス等のマイコバクテリウム属細菌等が挙げられる。

【0048】

メチロフィラス属細菌菌においてL-リジンの排出遺伝子を増強する場合は、その遺伝子断片を、メチロフィラス属細菌菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して、組換えDNAを作製し、これをメタノール資化性細菌の宿主に導入して形質転換すればよい。あるいは、トランスポゾンに搭載し、染色体への組み込みにより、また、メタノール資化性細菌内で強力転写を誘導するようなプロモーターを、その遺伝子上流に連結させることも可能である。

【0049】

上記のようなL-リジン生合成系遺伝子又はL-リジン排出遺伝子等の目的遺伝子をメチロフィラス属細菌に導入、増強するには、メチロフィラス属細菌細胞内で自律複製可能なベクターに遺伝子を連結して組換えDNAを作製し、それでメチロフィラス・メチロトロファスを、例えばエレクトロポレーション法などにより形質転換する方法があり、その他にトランスダクション、トランスポゾン (Berg, D. E. and Berg, C. M., Bio/Technol. 1, 417, (1983))、Muファージ、(特開平2-109985号) または相同組換え (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)) を用いた方法で宿主染色体に組み込むこともできる。

【0050】

前記メチロフィラス属細菌細胞内で自律複製可能なベクターとして具体的には、例えば、広宿主域ベクターであるRSF1010及びその誘導体、例えば、pAYC32 (Chistoserdov, A.Y., Tsygankov, Y.D., Plasmid, 1986, 16, 161-167)、あるいは pMFY42 (Gene, 44, 53 (1990)) や、pBBR1及びその誘導体に由来するもの (Kovach, M.E., et al., Gene, 166, 175-176 (1995))、さらには pRK310 及びその誘導体に由来のもの (Edts. Murrell, J.C., and Dalton, H., Methane and methanol utilizers, Plenum Press, 183-206 (1992)) 等が利用できる。

【0051】

リジン生産能を有し、かつ、リジンデカルボキシラーゼが低下又は消失したメチロフィラス属細菌は、リジンデカルボキシラーゼが低下又は消失したメチロフィラス属細菌にL-リジン生産能を付与することによって取得することができる。また、上記細菌は、L-リジン生産能を有するメチロフィラス属細菌のリジンデカルボキシラーゼが低下又は消失するように改変することによっても、取得することができる。

【0052】

<3>本発明のL-リジンの製造法

上記のようにして取得したリジンデカルボキシラーゼ活性が低下又は消失したメチロフィラス属細菌を、メタノールを主要炭素源とする液体培地に培養することにより、培養物中にL-リジンを生成蓄積させることができる。L-リジン生産能を有するメチロフィラス属細菌のリジンデカルボキシラーゼ活性を低下又は消失させることにより、L-リジン生産能を向上させることができる。

【0053】

L-リジン生産のために使用される培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機微量栄養源を含有する通常の培地である。主要炭素源としては、メタノールであるが、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトース、でんぷん加水分解物などの糖類、グリセロール、ソルビトールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸、ピルビン酸等の有機酸類を併用して用いることができる。「メタノールを主要炭素源とする」とは、全炭素源のうち、メタノールを50%(w/w)以上、好ましくは80%(w/w)以上であることをいう。

メタノールを炭素源として用いる場合の濃度は、通常は0.001%から4%(w/v)、好ましくは0.1%から2%(w/v)である。また、グルコース等を添加する場合の濃度は、通常、0.1%から3%(w/v)、好ましくは0.1%から1%(w/v)である。

【0054】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素源、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

【0055】

無機イオンとしては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。これらの他に、有機微量栄養源として、ビタミンB₁、または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい場合もある。

【0056】

培養は、好氣的条件下で16～72時間程度実施するのがよく、培養温度は25℃～45℃に、培養中pHは5～8に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、あるいはアンモニアガス等を使用することができる。

【0057】

培養終了後、発酵液からのL-リジンの採取は、通常のイオン交換樹脂法、沈澱法、その他の公知の方法を組み合わせることにより適宜実施できる。

【0058】

【実施例】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明する。

【0059】

【実施例1】メチロフィラス・メチロトロファスのリジンデカルボキシラーゼ遺伝子(ldc)のクローニング

メチロフィラス・メチロトロファスの野生株AS1株から染色体DNAを取得することを目的に、AS1株を50mLのSEII培地（組成：(NH₄)₂SO₄ 5g/L, K₂HPO₄ 1.9g/L, NaH₂PO₄·2H₂O 1.56g/L, MgSO₄·7H₂O 200mg/L, CaCl₂·2H₂O 72mg/L, CuSO₄·5H₂O 5μg/L, MnSO₄·5H₂O 25μg/L, ZnSO₄·7H₂O 23μg/L, FeCl₃·6H₂O 9.7mg/L, メタ

ノール 0.5%(W/V)) に植菌し、培養温度37℃で一晩振とう培養した。その後、培養液を遠心し、菌体を回収後、市販のキット (Edge Biosystems社製 Genomic DNA purification kit) を用いて、添付の操作マニュアルに従い染色体DNAを調製した。

【0060】

この染色体DNAを鋳型にして、配列番号1及び2に記載のDNAプライマーを用いて、PCR (反応条件: 宝酒造社製 Pyrobest polymeraseを用い、変性工程98℃-10秒間、アニーリング55℃-30秒間、DNA鎖の伸長反応72℃-3分間の反応を25サイクル) を行い、約3.0キロベースペア (以下、「kbp」と記載) の大きさのDNA断片を得た。

【0061】

そして、この取得した断片のDNA塩基配列を、Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Third Edition (2001)に記載の方法に従って決定した。そのDNA断片上の制限酵素EcoRV部位から制限酵素DdeI部位までの領域の塩基配列は、配列番号3に示す塩基配列であることが明らかになった。このDNA配列中には、配列番号4に示すアミノ酸配列をコードするオープンリーディングフレーム (以下、「orf」と略する場合がある) が含まれていた。また、このorfをorf#3098と命名した。また、前記配列番号4に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子をldc遺伝子と命名した。

【0062】

【実施例2】 ldc遺伝子を破壊したメチロフィラス・メチロトロファス株の作製

(1) ldc遺伝子破壊用断片の作製

実施例1で調製した染色体DNAを鋳型にして、配列番号5及び6に記載のDNAプライマーを用いて、PCR (反応条件: 宝酒造社製 TaKaRa Ex Taqを用い、変性工程94℃-30秒間、アニーリング60℃-30秒間、DNA鎖の伸長反応72℃-2分間の反応を25サイクル) を行い、約1.3kbの大きさのDNA断片を得た。また同様の条件で、配列番号7及び8に記載のプライマーを用いたPCRを行い、約2.0kbの大きさのDNA断片を得た。

【0063】

一方、プラスミドpKD4 (GenBank accession No. AY048743, Datsenko, K. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97 (12), 6640-6645, 2000) を鋳型にして、配列番号9及び10に記載のプライマーを用いて、上記と同じ条件でPCRを行い、カナマイシン耐性 (Km^R) 遺伝子を含むDNA断片(約1.5kb)を調製した。

【0064】

以上の3種のDNA断片を混ぜ合わせ、これを鋳型にして、配列番号11及び12に記載したプライマーを用いてPCR (反応条件: TaKaRa Ex Taqを用い、変性工程94℃-30秒間、アニーリング60℃-30秒間、DNA鎖の伸長反応72℃-4分30秒間の反応を25サイクル)を行い、約4.7kbの断片を取得した。この断片は、カナマイシン耐性遺伝子で分断されたldc遺伝子を含んでいる。この断片を市販のキット (Promega社製 Wizard PCR Preps DNA Purification System) を用いて精製後、エタノール沈殿操作を行い、TE溶液 (10mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA溶液) に溶解した。このDNA溶液を遺伝子破壊用断片として以下の操作に用いた。

【0065】

(2) メチロフィラス・メチロトロファスのldc遺伝子欠損株の取得

次に、メチロフィラス・メチロトロファスAS1株へ、上述した遺伝子破壊用断片を導入した。形質転換は、エレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43. 197 (1997)) を用いた。具体的には、以下のように行った。

【0066】

メチロフィラス・メチロトロファスAS1株をSEII液体培地 (但しメタノール濃度は0.5%(v/v)) で、37℃で16時間振とう培養し、その培養液20 mlを10,000rpm×10分間の遠心にかけて、菌体を集菌した。これに1mM HEPES (pH7.2) 緩衝液 (20 ml) を加えて懸濁した後、遠心するという操作を2回行い、最後に菌体に1mlの同溶液を加え、菌体懸濁液を調製し、エレクトロポレーション用のエレクトロセルとした。そして、上記のカナマイシン耐性遺伝子で分断されたldc遺伝子 ($ldc::Km^R$) を含むDNA断片の約1 μ g分を、エレクトロセル100 μ lに加え、18.5kV/cm, 25 μ F, 200 Ω の条件で電気パルスを与え、エレクトロポレーション処理を行

い、DNA断片を細胞内へ導入した。この菌懸濁液に直ちにSEII液体培地を加え、37℃で3時間培養した。

【0067】

前記培養液を、カナマイシン20 μ g/mlを含むSEII寒天培地に塗布後、37℃で培養した。培養を48時間行ったところ、プレート上に数十個のコロニーが出現した。そのうち20株を無作為に選択し、それらの株では目的どおりの遺伝子が破壊されているか否かを、PCR法による検出方法により確認した。即ち、出現したコロニーを滅菌水20 μ lに懸濁し、1mg/mlの濃度の Proteinase K溶液を5 μ l、更に25 μ LのP溶液 (40mM Tris、0.5% Tween20、1% Nonidet P-40、1mM EDTA (HClにてpH8.0に調整) からなる溶液) を添加した後、攪拌し、60℃で20分、次いで95℃で5分間、保温した。そして、この反応液を鋳型とし、配列番号11及び12に示すプライマーを用いたPCR (反応条件: TaKaRa Ex Taqを用い、変性過程94℃-30秒間、アニーリング過程60℃-30秒間、DNA鎖の伸長反応72℃-4分30秒間の反応を25サイクル) を行うことによって、目的遺伝子の破壊を確認したところ、10株が目的通りの破壊株であった。そこで、このうちの一株をDLC10株 (MLDC株) と命名し、以後の実験に使用した。

【0068】

(3) ldc遺伝子欠損株の表現型

上記(2)で作製したDLC10株は、カナマイシンを含むSEII寒天培地で生育する株として選択された株であるが、同様の寒天培地で植え継ぐと、生育しなくなることが判明した。そこで、リジンデカルボキシラーゼ (LDC) 及びアルギニンデカルボキシラーゼ (ADC) の、それぞれの反応生成物である、カダベリン (CAD) 及びアグマチン (AGM) を、培地へ添加することで、それらの生育阻害を相補出来るかどうか検討した。

【0069】

カナマイシン20 μ g/ml (μ g/ml) を含む液体SEII培地4mlに、カダベリン又はアグマチンを1g/lの濃度で添加した培地を作製した。そして、そこへ上記DLC10株を植菌し、37℃、116rpmで振とう培養し、その生育を調べた。その結果、DLC10株は、カダベリンあるいはアグマチンの無添加培地では生育出来ないが、どちら

か一方の物質の培地への添加によって生育可能となることが判明した。また、カダベリン添加の方が、アグマチン添加時と比べ、より良い生育回復効果が認められた。

【0070】

(4) orf#3098導入によるldc欠損株の相補性確認

上記のldc欠損株の生育のためのカダベリン要求性が、実施例1で取得したorf#3098の導入で相補できるのかどうかを検証した。まず、orf#3098のみを含むDNAを、ldc欠損株へ導入するためのプラスミドを作製した。実施例1に記載した染色体DNAを鋳型にし、配列番号13及び14に記載した配列をもつDNAプライマー(5'末端側にSse8387Iサイトを連結)を用いてPCRを行った(増幅反応条件は、宝酒造社製Pyrobest DNA polymeraseを用い、変性工程98℃-10秒間、アニーリング55℃-30秒間、DNA鎖の伸長反応72℃-3分間の反応を25サイクル)。得られた約3kbの大きさのDNA断片を、制限酵素Sse8387I(宝酒造)で消化した。一方、同じくSse8387Iで分解後、脱リン酸化処理を行ったベクターpRStacと、このDNA断片を連結した(宝酒造社製、Ligation Kit ver.2を使用)。このようにして作製したorf#3098の搭載プラスミド(tacプロモーターに対して順向き)をpRS-orf#3098と命名した。

【0071】

なお、pRStacは公知のプラスミドpRS(特表平3-501682号公報参照)を用いて、そこへtacプロモーターを導入することにより構築した。pRSは、RSF1010の誘導体である広宿主域ベクタープラスミドpAYC32(Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167)に由来するpVIC40プラスミド(W090/04636国際公開パンフレット、特表平3-501682号公報)より、同プラスミドが持つスレオニンオペロンをコードするDNA領域を削除してベクター部分のみを持つプラスミドである。

【0072】

まず、pRSより、tacプロモーターを持つプラスミドpRStacを構築した。pRSベクターを制限酵素EcoRIおよびPstIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エ

タノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルにて分離し、約8キロベースペアのDNA断片をEASY TRAP Ver.2 (DNA回収キット、宝酒造社製) を用いて回収した。一方、tacプロモーター領域を、pRK223-3プラスミド (発現用ベクター、Pharmacia社製) を鋳型とし、配列番号17および18に示すプライマーを用いて、PCRにより増幅した (変性94℃-20秒、アニーリング55℃-30秒、伸長反応72℃-60秒のサイクルを30サイクル行った) 。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase (宝酒造社製) を使用した。増幅されたtacプロモーターを含むDNA断片をPCRprep (Promega社製) を用いて精製した後、あらかじめプライマー中にデザインしておいた制限酵素サイト、すなわちEcoRIおよびEcoT22Iで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収した後、0.8%アガロースゲルで分離し、約0.15kbpのDNA断片をEASY TRAP Ver.2を用いて回収した。

【0073】

上記のようにして調製したpRSベクター消化物と、tacプロモーター領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造製) を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E. coli JM109 competent cells、宝酒造製) を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリーSDS法で各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で消化して構造を確認し、pRStacを得た。pRSベクター上のストレプトマイシン耐性遺伝子の転写方向とtacプロモーターの転写方向が同じ向きになっているものを、pRStacとして選択した。

【0074】

以上のようにして作製したプラスミドpRS-orf#3098、又は対照プラスミドであるpRStacを用いて、エレクトロポレーション法でDLC10株をそれぞれ形質転換し、SEII寒天培地 (但し、カナマイシン20 μ g/ml、ストレプトマイシン50 μ g/ml、カダベリン1g/lを含む) で選択した。

【0075】

選択されたDLC10/pRS-orf#3098株を、カダベリン無添加のSEII寒天培地 (カナ

マイシン20 μ g/ml、ストレプトマイシン50 μ g/mlを含む)に接種したところ、対照株のDLC10/pRStac株が生育出来なかったのに対し、pRStac-orf#3098導入株では生育が可能となった。また、DLC10/pRS-orf#3098株から、Promega社製Wizard Miniprepsを用いてプラスミドを抽出し、電気泳動によって確認したところ、目的通りのプラスミドを保持していることが確認されたため、この相補性は、プラスミド上のorf#3098がコードするタンパク質がトランスに作用して、発揮されたことが判明した。このことは、このorf#3098自身の欠損が、本菌の生育にカダベリン要求性を付与したといえる。

【0076】

【実施例3】E. coli由来のldcC遺伝子導入による、メチロフィラス・メチロトロファスorf#3098欠損の相補

(1) E. coli由来のldcC遺伝子を搭載したプラスミドの作製

E. coliに由来するldcC遺伝子が、DLC10株の生育へのカダベリン要求性を相補出来るのかを調べるために、まずE. coli由来のldcC搭載プラスミドを作製した。E. coli W3110株をLB培地(トリプトン10g/l、酵母エキス 5g/l、NaCl 10g/l)で37℃で一晩培養し、得られた菌体からEdge BioSystems社製 Genomic DNA Purif.Kitを用いて染色体DNAを調製した。この染色体DNAを鋳型にし、配列番号15及び16(J. Bacteriol., 1997, 179(14), 4486-4492)に記載した配列をもつDNAプライマー(5'末端側にPstIサイトを連結)を用いてPCRを行った(増幅反応条件は、宝酒造社製Pyrobest DNA polymeraseを用い、変性工程98℃-10秒間、アニーリング60℃-30秒間、DNA鎖の伸長反応72℃-2分間の反応を25サイクル)。得られた約2.3kbのDNA断片を、PstI(宝酒造)で分解した。一方、ベクターpRStacを制限酵素Sse8387Iで分解後、脱リン酸化処理を行い、上記のPCR断片と連結した(宝酒造社製、Ligation Kit ver.2を使用)。このようにして作製したE. coliのldcCを搭載したプラスミドをpRS-ldcC-F(tacプロモーターに対して順向き)及びpRS-ldcC-R(tacプロモーターに対して逆向き)と命名した。

【0077】

(2) E. coli由来LDCによるDLC10株のorf#3098欠損の相補性確認

上記のようにして作製した両プラスミドで、エレクトロポレーション法により

DLC10株を形質転換し、SEII寒天培地（カナマイシン $20\mu\text{g/ml}$ 、ストレプトマイシン $50\mu\text{g/ml}$ 、カダベリン 1g/l を含む）で形質転換体を選択したところ、pRStac-ldcC-Fでは形質転換体は取得できず、pRStac-ldcC-Rによる形質転換体のみが得られた。

【0078】

このDLC10/pRStac-ldcC-R株を、カダベリンを含まない寒天培地SEII（カナマイシン $20\mu\text{g/ml}$ とストレプトマイシン $50\mu\text{g/ml}$ を含む）に塗布したところ、対照株であるDLC10/pRS-tac株は生育出来ないのに対し、DLC10/pRStac-ldcC-R株では生育可能となることを確認した。このことは、E. coliのLDC（リジンデカルボキシラーゼ）が、メチロフィラス・メチロトロファスのorf#3098欠損株のカダベリン要求性を相補できたことを示すものである。

【0079】

【実施例4】 orf#3098（ldc遺伝子）を破壊したメチロフィラス・メチロトロファス株によるL-リジンの生産

（1）L-リジン生産プラスミドpRSlysE24の構築

まず、メチロフィラス属細菌に、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいてリジンの排出活性を発揮する蛋白質をコードするlysE遺伝子を導入するために、前記pRStacを用いて、lysE発現用プラスミドpRSlysEを構築した。

実施例2の（4）のようにして作製したpRStacを、Sse8387I（宝酒造製）およびSapI（ニューイングランドバイオラボ社製）で消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿によりDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約9.0kbpのDAN断片を回収した。

【0080】

また、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム2256株（ATCC13869）より抽出した染色体を鋳型として、配列番号19および20に示すプライマーを用いたPCR法（変性 94°C -20秒、アニーリング 55°C -30秒、伸長反応 72°C -90秒）によりlysE遺伝子断片を増幅した。PCR反応には、Pyrobest DNA polymerase（宝酒造社製）を使用した。得られた断片をPCRprep（Promega社製）を用いて精製した後、

制限酵素Sse8387IおよびSapIで消化した。フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿によりDNAを回収し、0.8%アガロースゲルで精製し、回収した。

【0081】

上記のようにして調製したpRStacベクター消化物と、lysE遺伝子領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造製) を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E. coli JM109 competent cells、宝酒造製) を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリー-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSlysEを得た。pRSlysEは、tacプロモーターの転写方向に対して、lysE遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

【0082】

上記のようにして得られたpRSlysEを、エレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43. 197 (1997)) によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB10515) に導入した。その結果、ほとんど形質転換体が取得できなかった。また、コロニー形成ができた数個の株から、導入したプラスミドを抽出して塩基配列を調べたところ、lysE遺伝子に変異が導入されており、それらのコロニーを培養しても、それらの培養上清中にL-リジンが蓄積することもなかった。しかしながら、更に多数のコロニーを調べたところ、変異が導入されたpRSlysEの解析を行ううちに、メチロフィラス属細菌にL-リジン生産能を付与し得る、即ち、機能する変異型lysE遺伝子を取得することができた。

【0083】

この変異型lysE遺伝子をlysE24遺伝子と命名した。lysE24遺伝子の塩基配列を解析したところ、この変異はアミノ酸置換が起こる変異ではなく、lysEの翻訳領域内のほぼ中央に終止コドンが導入されるナンセンス変異であることがわかった。野生型lysE遺伝子の塩基配列及び同遺伝子がコードするアミノ酸配列を、それぞれ配列番号21及び配列番号22に示す。lysE24では、配列番号21の355位のG (グ

アニン)のあとにT(チミン)が挿入されていた。lysE24の塩基配列及び同遺伝子がコードするアミノ酸配列を、それぞれ配列番号23及び配列番号24に示す。このlysE24を持つプラスミドをpRSlysE24と命名した。

【0084】

(2) dapA^{*}遺伝子を持つプラスミドpRSdapAの作製

L-リジン生合成系酵素遺伝子として、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子(dapA^{*})を持つプラスミドを作製した。

【0085】

実施例2の(4)で作製したpRStacをSse8387IおよびXbaIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約9kbpのDNA断片を回収した。

【0086】

dapA^{*}遺伝子断片は、同遺伝子を含む公知のプラスミドRSFD80(W090/16042号参照)を鋳型として、配列番号25および26に示すプライマーを用いたPCR法(変性94℃-20秒、アニーリング55℃-30秒、伸長反応72℃-60秒)により増幅した。PCR反応には、Pyrobest DNA polymerase(宝酒造社製)を使用した。得られたdapA遺伝子断片をPCRprep(Promega社製)にて精製した後、制限酵素Sse8387IおよびXbaIで消化した。フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収し、0.8%アガロースゲルで分離後、約0.1kbpのDNA断片を回収した。

【0087】

上記のように調製したpRStacベクター消化物と、dapA^{*}遺伝子領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造製)を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ(E. coli JM109 competent cells、宝酒造社)を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリーSDS法にて各培養液からプラ

スミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSdapAプラスミドを得た。pRSdapAプラスミドは、tacプロモーターの転写方向に対して、dapA遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

【0088】

(3) lysE24遺伝子及びdapA^{*}遺伝子を持つプラスミドpRSlysEdapAの構築

pRSlysEプラスミドにdapA^{*}遺伝子を挿入したプラスミドを構築した。実施例4の(1)で作製したpRSlysE24を制限酵素SapIで消化し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製)を用いて末端を平滑化した。また、実施例4の(2)で作製したpRSdapAを制限酵素EcoRIおよびSapIで消化し、0.8%アガロースゲルにより約1kbpのtacプロモーターおよびdapA^{*}領域を含む断片を分離し、同断片をEASY TRAP Ver2(宝酒造製)を用いて回収した。この断片を前記と同様にして平滑化し、前記のpRSlysE24の消化物と、DNA Ligation Kit Ver2 (宝酒造製)を用いて連結した。

【0089】

上記の連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E. coli JM109 competent cells、宝酒造社製) を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し37℃で8時間振盪培養した。各培養液から、アルカリ-SDS法によりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSlysEdapAプラスミドを得た。このプラスミドは、lysE24遺伝子とdapA^{*}遺伝子の各遺伝子の転写の向きが同一になるように配置されている。

【0090】

pRSlysEdapAプラスミドで形質転換されたE. coli JM109株はAJ13832と命名され、同株は2001年6月4日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM P-18371として寄託され、平成14年5月13日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-8042の受託番号のもとで寄託されている。

【0091】

(4) メチロフィラス・メチロトロファスのorf#3098(ldc)欠損株へのL-リジン生産プラスミドの導入とL-リジン生産

メチロフィラス・メチロトロファスのL-リジン生産に及ぼす、ldc遺伝子欠損の影響を調べた。まず、実施例2で作製したDLC10株は、野生株から作製していることから、L-リジンを生産する性質は改変されていない。そこで、ldc欠損によるL-リジン生産への影響を効果的に検証するために、メチロフィラス・メチロトロファスAS1株にpRSlysEdapAが導入された株から、実施例2(2)と同様の操作によって、ldc破壊株を作製した。ここで得られた株をDLC12/ pRSlysEdapA株と命名した。

【0092】

対照株であるAS1/pRSlysEdapA株をSEII(ストレプトマイシン 50 μ g/mlを含む)寒天培地に、DLC12/ pRSlysEdapA株をSEII(ストレプトマイシン 50 μ g/mlおよびカダベリン1g/lを含む)寒天培地に塗り広げ、37℃で1晩培養した後、培地表面の約3 cm²(平方センチメートル)の菌体をかきとって、カダベリン1g/Lを含むSEII生産培地(ストレプトマイシン 50 μ g/mlを含む)20mlに植菌し、37℃で67時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計(日本分光製、高速液体クロマトグラフィー)で定量した。その結果、AS1/pRSlysEdapA株は培地中へのL-リジン蓄積が1.26g/Lであったが、DLC12/pRSlysEdapA株は培地中にL-リジンを1.79g/L蓄積しており、ldcを欠損させることにより、L-リジンの生産性を向上し得ることが確認できた。

【0093】

【発明の効果】

本発明により、新規なリジンデカルボキシラーゼ及び同酵素をコードする遺伝子が提供可能となる。一方、L-リジン生産能を有し、当該遺伝子の発現が抑えられているメチロフィラス属細菌を培養することにより、効率的にL-リジンを製造することができる。

【0094】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> Novel lysine decarboxylase gene and method for
producing L-lysine

<130> P-B0650

<140>

<141> 2003-02-25

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 1

gcgagctcag cgcgagtgac tggatatcgg a

31

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 2

gcggtaccac tgtataaata gcaaaggcaa c

31

<210> 3

<211> 2964

<212> DNA

<213> Methylophilus methylotrophus

<220>

<221> CDS

<222> (684)..(2930)

<400> 3

gatatcgga tgagcattaa gtctgacaaa tggatacgca gaatggctga acaacacggc 60
atgattgagc cgtttgagcc caagcttgta cgtgagacca atggccagaa gattgtttct 120
tatggcacct cttcttacgg ttacgatatc cgttgtgctg acgaattccg cgtatttacc 180
aatatcaaca gcaccatagt tgaccccaag caatttgacc cgcagtcggt tgtcgaggtc 240
tccggcaaag gctattgcgt gattccccct aactcatttg cactggcgcg cacggtagag 300
tatttccgta ttcctcgctc tgtactgact gtatgcctcg gcaagtcgac ttatgcgcgt 360
tgcggcatta tcgtcaacgt ccccccttt gaaccagagt gggaaggcta tgtcacacta 420
gagttcagca acaccacacc gctacccgcc aaaatttatg ctggcgaagg ctgtgcgcaa 480
gtgctgttct ttgagtctga tgaaatctgt gaaacgagct acaaagaccg tggtggtaaa 540
taccagggtc aaattggcgt gaccctgcc aaaaataaac ggcaacattg aacaataacc 600

tgacattcac caagggcacg gtgcaaagca aatgctttct ctgtgccctt gtgtcttgat 660
 tttagcggta aaggatttat tgc atg aaa ttt aga ttc cct atc gtc att att 713

Met Lys Phe Arg Phe Pro Ile Val Ile Ile

1

5

10

gac gag gac ttc cgc tcc gag aac tct tcc ggc ctg ggc atc cgt gtg 761

Asp Glu Asp Phe Arg Ser Glu Asn Ser Ser Gly Leu Gly Ile Arg Val

15

20

25

ctg gcg aaa gcc atc gaa gat gag ggc ctg gaa gtg ctt ggc gtc acc 809

Leu Ala Lys Ala Ile Glu Asp Glu Gly Leu Glu Val Leu Gly Val Thr

30

35

40

agc tat ggc gac ctg acc tct ttc gcc cag cag caa agc cgt gca tca 857

Ser Tyr Gly Asp Leu Thr Ser Phe Ala Gln Gln Gln Ser Arg Ala Ser

45

50

55

gcc ttt atc ctg tcg att gat gat gag gaa atc gtt gag gag aaa ccg 905

Ala Phe Ile Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ile Val Glu Glu Lys Pro

60

65

70

gaa gcc att gag caa ctg cgt aac ttt gtg cag gaa atc cgt tac cgc 953

Glu Ala Ile Glu Gln Leu Arg Asn Phe Val Gln Glu Ile Arg Tyr Arg

75

80

85

90

aac gag gaa atc ccc att ttc ctg cat ggc gaa acc cgt acc agc cgt 1001

Asn Glu Glu Ile Pro Ile Phe Leu His Gly Glu Thr Arg Thr Ser Arg

95

100

105

cac atc cct aac gat gtg ttg cgc gag ttg cac ggc ttt atc cat atg 1049

His Ile Pro Asn Asp Val Leu Arg Glu Leu His Gly Phe Ile His Met

110

115

120

aat gaa gac acg cct gag ttt gtg gcg cgc ctg att atc cgc gaa gcc 1097

Asn Glu Asp Thr Pro Glu Phe Val Ala Arg Leu Ile Ile Arg Glu Ala

125

130

135

aaa gcc tac ctg gac agc ttg cca ccg ccc ttc ttc aag gca ctc act 1145

Lys Ala Tyr Leu Asp Ser Leu Pro Pro Pro Phe Phe Lys Ala Leu Thr
 140 145 150
 cat tac gcg gct gat ggc tct tat tca tgg cac tgt cct ggt cac tcg 1193
 His Tyr Ala Ala Asp Gly Ser Tyr Ser Trp His Cys Pro Gly His Ser
 155 160 165 170
 ggt ggc gta gcc ttt ctg aaa tcc cca gtc ggg cag atg ttc cac cag 1241
 Gly Gly Val Ala Phe Leu Lys Ser Pro Val Gly Gln Met Phe His Gln
 175 180 185
 ttt ttt ggc gag aac atg ctg cgt gca gac gtg tgt aat gcg gta gat 1289
 Phe Phe Gly Glu Asn Met Leu Arg Ala Asp Val Cys Asn Ala Val Asp
 190 195 200
 gaa tta ggc caa tta ctg gat cac acc ggc ccg gtg gcc gct tct gag 1337
 Glu Leu Gly Gln Leu Leu Asp His Thr Gly Pro Val Ala Ala Ser Glu
 205 210 215
 cgc aac gct gcg cgc atc tac aac tgc gac cat ttg tac ttt gtc act 1385
 Arg Asn Ala Ala Arg Ile Tyr Asn Cys Asp His Leu Tyr Phe Val Thr
 220 225 230
 aac ggc acc tca aca tcg aac aag att gtc tgg aac tca acc gtg gcg 1433
 Asn Gly Thr Ser Thr Ser Asn Lys Ile Val Trp Asn Ser Thr Val Ala
 235 240 245 250
 ccg ggt gat att gta gtg gtt gat cgt aac tgc cat aaa tcc gta ttg 1481
 Pro Gly Asp Ile Val Val Val Asp Arg Asn Cys His Lys Ser Val Leu
 255 260 265
 cac tcc atc att atg acg ggt gcc gtg ccc gtg ttc ctg atg cca acg 1529
 His Ser Ile Ile Met Thr Gly Ala Val Pro Val Phe Leu Met Pro Thr
 270 275 280
 cgc aac cat ttc ggc att atc ggg cct atc cca aaa agt gaa ttc gcc 1577
 Arg Asn His Phe Gly Ile Ile Gly Pro Ile Pro Lys Ser Glu Phe Ala
 285 290 295

tgg gaa aac atc cag aaa aag atc gca cgc aac ccg ttt gcc acc gac 1625
Trp Glu Asn Ile Gln Lys Lys Ile Ala Arg Asn Pro Phe Ala Thr Asp
300 305 310

aaa aat gcc aag cca cgc gtg ctg acc att aca cag tcc acc tat gat 1673
Lys Asn Ala Lys Pro Arg Val Leu Thr Ile Thr Gln Ser Thr Tyr Asp
315 320 325 330

ggc gtg ttg tat aac gtg gaa gaa atc aag gaa atg ctg gat ggc aaa 1721
Gly Val Leu Tyr Asn Val Glu Glu Ile Lys Glu Met Leu Asp Gly Lys
335 340 345

att gac acc ctg cac ttt gac gaa gcc tgg ttg cca cat gcg acc ttc 1769
Ile Asp Thr Leu His Phe Asp Glu Ala Trp Leu Pro His Ala Thr Phe
350 355 360

cat gac ttt tat ggt gac tac cat gcg att ggc gct gac cgc cca cgc 1817
His Asp Phe Tyr Gly Asp Tyr His Ala Ile Gly Ala Asp Arg Pro Arg
365 370 375

tgt aaa gaa tcc atg gtg ttc tcc acc cag tcc acg cac aaa cta ttg 1865
Cys Lys Glu Ser Met Val Phe Ser Thr Gln Ser Thr His Lys Leu Leu
380 385 390

gca ggc cta agc cag gcc tcg cag att ctg gta cag gat gcc gac cag 1913
Ala Gly Leu Ser Gln Ala Ser Gln Ile Leu Val Gln Asp Ala Asp Gln
395 400 405 410

aac cgc ctg gac cgt gac gtg ttc aac gaa gcc tat ttg atg cac acc 1961
Asn Arg Leu Asp Arg Asp Val Phe Asn Glu Ala Tyr Leu Met His Thr
415 420 425

tcc acc agc ccg caa tat tca att att gcc agc tgc gac gtc gct gct 2009
Ser Thr Ser Pro Gln Tyr Ser Ile Ile Ala Ser Cys Asp Val Ala Ala
430 435 440

gcc atg atg gaa gcc cct ggt ggc acc gcc ctg gta gaa gaa tcc ctc 2057
Ala Met Met Glu Ala Pro Gly Gly Thr Ala Leu Val Glu Glu Ser Leu

445	450	455	
aaa gaa gcg ttg gac ttc cgc cgc gcc atg cgc aag gtc gac gaa gaa	2105		
Lys Glu Ala Leu Asp Phe Arg Arg Ala Met Arg Lys Val Asp Glu Glu			
460	465	470	
tgg ggc aca gac tgg tgg ttt aaa gtc tgg ggt cca act gac ctg tcc	2153		
Trp Gly Thr Asp Trp Trp Phe Lys Val Trp Gly Pro Thr Asp Leu Ser			
475	480	485	490
gaa gac ggc ctg gaa gaa cgt gac gcg tgg atg ctc aaa gcc aat gaa	2201		
Glu Asp Gly Leu Glu Glu Arg Asp Ala Trp Met Leu Lys Ala Asn Glu			
495	500	505	
cgc tgg cat ggc ttc ggc aac ctg gcc gaa ggc ttt aac atg ctg gat	2249		
Arg Trp His Gly Phe Gly Asn Leu Ala Glu Gly Phe Asn Met Leu Asp			
510	515	520	
ccg atc aaa gcc acc atc atc acc cca gga cta gac gta gaa ggc gac	2297		
Pro Ile Lys Ala Thr Ile Ile Thr Pro Gly Leu Asp Val Glu Gly Asp			
525	530	535	
ttt tcc gat gaa ttc ggc atc ccc gct gcc att gtc acc aag tac ctg	2345		
Phe Ser Asp Glu Phe Gly Ile Pro Ala Ala Ile Val Thr Lys Tyr Leu			
540	545	550	
gct gaa cac ggt gtg atc gtt gaa aaa acc ggt tta tac tca ttc ttt	2393		
Ala Glu His Gly Val Ile Val Glu Lys Thr Gly Leu Tyr Ser Phe Phe			
555	560	565	570
atc atg ttc acc atc ggc att acc aaa ggc cgc tgg aac acg atg gtg	2441		
Ile Met Phe Thr Ile Gly Ile Thr Lys Gly Arg Trp Asn Thr Met Val			
575	580	585	
gcc gcg tta caa caa ttt aaa gac gac tac gac aag aat cag ccg ctg	2489		
Ala Ala Leu Gln Gln Phe Lys Asp Asp Tyr Asp Lys Asn Gln Pro Leu			
590	595	600	
tgg aaa gtg ctg cct gag ttt gta cag aaa cat cca cgc tat gaa cgc	2537		

Trp Lys Val Leu Pro Glu Phe Val Gln Lys His Pro Arg Tyr Glu Arg
 605 610 615
 gta ggc ctg aaa gat cta tgc acg cag att cat gaa gtt tac aaa gct 2585
 Val Gly Leu Lys Asp Leu Cys Thr Gln Ile His Glu Val Tyr Lys Ala
 620 625 630
 aac gac gta gca cgc ctg acc aca gaa atg tac ctg tct gac atg gtg 2633
 Asn Asp Val Ala Arg Leu Thr Thr Glu Met Tyr Leu Ser Asp Met Val
 635 640 645 650
 cca gcc atg aaa ccg acc gat gct ttc tca aaa atg gcg cat cgc aaa 2681
 Pro Ala Met Lys Pro Thr Asp Ala Phe Ser Lys Met Ala His Arg Lys
 655 660 665
 att gaa cgc gta gcc att gat gac ctc gaa ggc cgc gtc act gca gtg 2729
 Ile Glu Arg Val Ala Ile Asp Asp Leu Glu Gly Arg Val Thr Ala Val
 670 675 680
 ctg tta acg ccc tat ccg cca ggc atc ccg ttg ctg atc cct ggc gaa 2777
 Leu Leu Thr Pro Tyr Pro Pro Gly Ile Pro Leu Leu Ile Pro Gly Glu
 685 690 695
 cgc ttt aac aaa gtc att gtg aac tac ctc aag ttt gcg cgc gag ttt 2825
 Arg Phe Asn Lys Val Ile Val Asn Tyr Leu Lys Phe Ala Arg Glu Phe
 700 705 710
 aat gag aaa ttc cca ggc ttt gag acg gat aac cat gga tta gtg aag 2873
 Asn Glu Lys Phe Pro Gly Phe Glu Thr Asp Asn His Gly Leu Val Lys
 715 720 725 730
 caa ata gtc gat ggt aaa gcc gtg tat tat gtg gat tgc gtg aag caa 2921
 Gln Ile Val Asp Gly Lys Ala Val Tyr Tyr Val Asp Cys Val Lys Gln
 735 740 745
 gaa gat taa atttttagtt tcactcagca gtttttctac tgag 2964
 Glu Asp

<210> 4

<211> 748

<212> PRT

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<400> 4

Met Lys Phe Arg Phe Pro Ile Val Ile Ile Asp Glu Asp Phe Arg Ser

1

5

10

15

Glu Asn Ser Ser Gly Leu Gly Ile Arg Val Leu Ala Lys Ala Ile Glu

20

25

30

Asp Glu Gly Leu Glu Val Leu Gly Val Thr Ser Tyr Gly Asp Leu Thr

35

40

45

Ser Phe Ala Gln Gln Gln Ser Arg Ala Ser Ala Phe Ile Leu Ser Ile

50

55

60

Asp Asp Glu Glu Ile Val Glu Glu Lys Pro Glu Ala Ile Glu Gln Leu

65

70

75

80

Arg Asn Phe Val Gln Glu Ile Arg Tyr Arg Asn Glu Glu Ile Pro Ile

85

90

95

Phe Leu His Gly Glu Thr Arg Thr Ser Arg His Ile Pro Asn Asp Val

100

105

110

Leu Arg Glu Leu His Gly Phe Ile His Met Asn Glu Asp Thr Pro Glu

115

120

125

Phe Val Ala Arg Leu Ile Ile Arg Glu Ala Lys Ala Tyr Leu Asp Ser

130

135

140

Leu Pro Pro Pro Phe Phe Lys Ala Leu Thr His Tyr Ala Ala Asp Gly

145

150

155

160

Ser Tyr Ser Trp His Cys Pro Gly His Ser Gly Gly Val Ala Phe Leu

165

170

175

Lys Ser Pro Val Gly Gln Met Phe His Gln Phe Phe Gly Glu Asn Met

180

185

190

Leu Arg Ala Asp Val Cys Asn Ala Val Asp Glu Leu Gly Gln Leu Leu
 195 200 205
 Asp His Thr Gly Pro Val Ala Ala Ser Glu Arg Asn Ala Ala Arg Ile
 210 215 220
 Tyr Asn Cys Asp His Leu Tyr Phe Val Thr Asn Gly Thr Ser Thr Ser
 225 230 235 240
 Asn Lys Ile Val Trp Asn Ser Thr Val Ala Pro Gly Asp Ile Val Val
 245 250 255
 Val Asp Arg Asn Cys His Lys Ser Val Leu His Ser Ile Ile Met Thr
 260 265 270
 Gly Ala Val Pro Val Phe Leu Met Pro Thr Arg Asn His Phe Gly Ile
 275 280 285
 Ile Gly Pro Ile Pro Lys Ser Glu Phe Ala Trp Glu Asn Ile Gln Lys
 290 295 300
 Lys Ile Ala Arg Asn Pro Phe Ala Thr Asp Lys Asn Ala Lys Pro Arg
 305 310 315 320
 Val Leu Thr Ile Thr Gln Ser Thr Tyr Asp Gly Val Leu Tyr Asn Val
 325 330 335
 Glu Glu Ile Lys Glu Met Leu Asp Gly Lys Ile Asp Thr Leu His Phe
 340 345 350
 Asp Glu Ala Trp Leu Pro His Ala Thr Phe His Asp Phe Tyr Gly Asp
 355 360 365
 Tyr His Ala Ile Gly Ala Asp Arg Pro Arg Cys Lys Glu Ser Met Val
 370 375 380
 Phe Ser Thr Gln Ser Thr His Lys Leu Leu Ala Gly Leu Ser Gln Ala
 385 390 395 400
 Ser Gln Ile Leu Val Gln Asp Ala Asp Gln Asn Arg Leu Asp Arg Asp
 405 410 415
 Val Phe Asn Glu Ala Tyr Leu Met His Thr Ser Thr Ser Pro Gln Tyr

420 425 430
Ser Ile Ile Ala Ser Cys Asp Val Ala Ala Ala Met Met Glu Ala Pro
435 440 445
Gly Gly Thr Ala Leu Val Glu Glu Ser Leu Lys Glu Ala Leu Asp Phe
450 455 460
Arg Arg Ala Met Arg Lys Val Asp Glu Glu Trp Gly Thr Asp Trp Trp
465 470 475 480
Phe Lys Val Trp Gly Pro Thr Asp Leu Ser Glu Asp Gly Leu Glu Glu
485 490 495
Arg Asp Ala Trp Met Leu Lys Ala Asn Glu Arg Trp His Gly Phe Gly
500 505 510
Asn Leu Ala Glu Gly Phe Asn Met Leu Asp Pro Ile Lys Ala Thr Ile
515 520 525
Ile Thr Pro Gly Leu Asp Val Glu Gly Asp Phe Ser Asp Glu Phe Gly
530 535 540
Ile Pro Ala Ala Ile Val Thr Lys Tyr Leu Ala Glu His Gly Val Ile
545 550 555 560
Val Glu Lys Thr Gly Leu Tyr Ser Phe Phe Ile Met Phe Thr Ile Gly
565 570 575
Ile Thr Lys Gly Arg Trp Asn Thr Met Val Ala Ala Leu Gln Gln Phe
580 585 590
Lys Asp Asp Tyr Asp Lys Asn Gln Pro Leu Trp Lys Val Leu Pro Glu
595 600 605
Phe Val Gln Lys His Pro Arg Tyr Glu Arg Val Gly Leu Lys Asp Leu
610 615 620
Cys Thr Gln Ile His Glu Val Tyr Lys Ala Asn Asp Val Ala Arg Leu
625 630 635 640
Thr Thr Glu Met Tyr Leu Ser Asp Met Val Pro Ala Met Lys Pro Thr
645 650 655

Asp Ala Phe Ser Lys Met Ala His Arg Lys Ile Glu Arg Val Ala Ile
660 665 670
Asp Asp Leu Glu Gly Arg Val Thr Ala Val Leu Leu Thr Pro Tyr Pro
675 680 685
Pro Gly Ile Pro Leu Leu Ile Pro Gly Glu Arg Phe Asn Lys Val Ile
690 695 700
Val Asn Tyr Leu Lys Phe Ala Arg Glu Phe Asn Glu Lys Phe Pro Gly
705 710 715 720
Phe Glu Thr Asp Asn His Gly Leu Val Lys Gln Ile Val Asp Gly Lys
725 730 735
Ala Val Tyr Tyr Val Asp Cys Val Lys Gln Glu Asp
740 745

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5

aaggctgtgc gcaagtgctg ttctttgagt

30

<210> 6

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6

ccagcctaca caatcgctca agacgtgtaa tgcacgcatg gtagtcacca taaaagtcac 60
ggaa 64

<210> 7

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7

ggctaattcc catgtcagcc gttaagtgtt ccatgaacta cctcaagttt gcgcgcgagt 60
ttaa 64

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8

ggttggtatc agtgtagaca cggttgcaag 30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 9

gcattacacg tcttgagcga ttgtgtaggc

30

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 10

ggaacactta acggctgaca tgggaattag cc

32

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 11

aacctgacat tcaccaaggg cacggtgcaa

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12

tttgcgcaaa agcatcgatt atccttcccc

30

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13

gccctgcagg agcgcgagtg actggatatc gga

33

<210> 14

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14

gccctgcagg ctgtataaat agcaaaggca ac

32

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 15

gcctgcagta aggaaggatt ttccaggagg aacac

35

<210> 16

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 16

gcctgcagaa gctttgctca ccgcataatc cgtcgcaa

38

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 17

agggaattcc ccgttctgga taatgttttt tgcgccgac

39

<210> 18

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 18

cggatgcatc tagagttaac ctgcagggtg aaattgttat ccgctcacia ttccacac 58

<210> 19

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 19

catttcctgc aggcaaagga gatgagcgta atggtgatca tggaaatctt cattacaggt 60
ctgc 64

<210> 20

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 20

gggcgagcta gaagagctcc aaaacccgcg aaaactaacc catcaacatc 50

<210> 21

<211> 711

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(711)

<400> 21

atg gtg atc atg gaa atc ttc att aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt 48

Met	Val	Ile	Met	Glu	Ile	Phe	Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Ser	
1			5					10					15			
ctt	tta	ctg	tcc	atc	gga	ccg	cag	aat	gta	ctg	gtg	att	aaa	caa	gga	96
Leu	Leu	Leu	Ser	Ile	Gly	Pro	Gln	Asn	Val	Leu	Val	Ile	Lys	Gln	Gly	
			20					25					30			
att	aag	cgc	gaa	gga	ctc	att	gcg	ggt	ctt	ctc	gtg	tgt	tta	att	tct	144
Ile	Lys	Arg	Glu	Gly	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	
			35					40					45			
gac	gtc	ttt	ttg	ttc	atc	gcc	ggc	acc	ttg	ggc	ggt	gat	ctt	ttg	tcc	192
Asp	Val	Phe	Leu	Phe	Ile	Ala	Gly	Thr	Leu	Gly	Val	Asp	Leu	Leu	Ser	
			50					55					60			
aat	gcc	gcg	ccg	atc	gtg	ctc	gat	att	atg	cgc	tgg	ggt	ggc	atc	gct	240
Asn	Ala	Ala	Pro	Ile	Val	Leu	Asp	Ile	Met	Arg	Trp	Gly	Gly	Ile	Ala	
			65					70					75		80	
tac	ctg	tta	tgg	ttt	gcc	gtc	atg	gca	gcg	aaa	gac	gcc	atg	aca	aac	288
Tyr	Leu	Leu	Trp	Phe	Ala	Val	Met	Ala	Ala	Lys	Asp	Ala	Met	Thr	Asn	
								85					90		95	
aag	gtg	gaa	gcg	cca	cag	atc	att	gaa	gaa	aca	gaa	cca	acc	gtg	ccc	336
Lys	Val	Glu	Ala	Pro	Gln	Ile	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu	Pro	Thr	Val	Pro	
								100					105		110	
gat	gac	acg	cct	ttg	ggc	ggt	tcg	gcg	gtg	gcc	act	gac	acg	cgc	aac	384
Asp	Asp	Thr	Pro	Leu	Gly	Gly	Ser	Ala	Val	Ala	Thr	Asp	Thr	Arg	Asn	
								115					120		125	
cgg	gtg	cgg	gtg	gag	gtg	agc	gtc	gat	aag	cag	cgg	ggt	tgg	gta	aag	432
Arg	Val	Arg	Val	Glu	Val	Ser	Val	Asp	Lys	Gln	Arg	Val	Trp	Val	Lys	
								130					135		140	
ccc	atg	ttg	atg	gca	atc	gtg	ctg	acc	tgg	ttg	aac	ccg	aat	gcg	tat	480
Pro	Met	Leu	Met	Ala	Ile	Val	Leu	Thr	Trp	Leu	Asn	Pro	Asn	Ala	Tyr	
								145					150		155	160

ttg gac gcg ttt gtg ttt atc ggc ggc gtc ggc gcg caa tac ggc gac 528
 Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp

165

170

175

acc gga cgg tgg att ttc gcc gct ggc gcg ttc gcg gca agc ctg atc 576
 Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile

180

185

190

tgg ttc ccg ctg gtg ggt ttc ggc gca gca gca ttg tca cgc ccg ctg 624
 Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu

195

200

205

tcc agc ccc aag gtg tgg cgc tgg atc aac gtc gtc gtg gca gtt gtg 672
 Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val

210

215

220

atg acc gca ttg gcc atc aaa ctg atg ttg atg ggt tag 711
 Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly

225

230

235

<210> 22

<211> 236

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 22

Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser

1

5

10

15

Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly

20

25

30

Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser

35

40

45

Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser

50	55	60		
Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala				
65	70	75	80	
Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn				
	85	90	95	
Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro				
100	105	110		
Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn				
115	120	125		
Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys				
130	135	140		
Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr				
145	150	155	160	
Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp				
165	170	175		
Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile				
180	185	190		
Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu				
195	200	205		
Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val				
210	215	220		
Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly				
225	230	235		

<210> 23

<211> 712

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (375)

<400> 23

```

atg gtg atc atg gaa atc ttc att aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt 48
Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser
  1           5           10          15
ctt ttg ctg tcc atc gga ccg cag aat gta ctg gtg att aaa caa gga 96
Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly
      20           25           30
att aag cgc gaa gga ctc att gcg gtt ctt ctc gtg tgt tta att tct 144
Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser
      35           40           45
gac gtc ttt ttg ttc atc gcc ggc acc ttg ggc gtt gat ctt ttg tcc 192
Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser
      50           55           60
aat gcc gcg ccg atc gtg ctc gat att atg cgc tgg ggt ggc atc gct 240
Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala
      65           70           75           80
tac ctg tta tgg ttf gcc gtc atg gca gcg aaa gac gcc atg aca aac 288
Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn
      85           90           95
aag gtg gaa gcg cca cag atc att gaa gaa aca gaa cca acc gtg ccc 336
Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro
      100          105          110
gat gac acg cct ttg ggc gtg ttc ggc ggt ggc cac tga cacgcgcaac 385
Asp Asp Thr Pro Leu Gly Val Phe Gly Gly Gly His
      115          120          125

```

cgggtgcggg tggaggtgag cgtcgataag cagcgggttt gggatgaagcc catgttgatg 445
 gcaatcgtgc tgacctggtt gaacccgaat gcgtatttgg acgcgtttgt gtttatcggc 505
 ggcgctcgcg cgcaatacgg cgacaccgga cggatggattt tcgccgctgg cgcgttcgcg 565
 gcaagcctga tctggttccc gctggtgggt ttcggcgcag cagcattgtc acgcccgtg 625
 tccagcccca aggtgtggcg ctggatcaac gtcgtcgtgg cagttgtgat gaccgcattg 685
 gccatcaaac tgatgttgat gggtag 712

<210> 24

<211> 124

<212> PRT

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

<400> 24

Met	Val	Ile	Met	Glu	Ile	Phe	Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Ser
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Ser	Ile	Gly	Pro	Gln	Asn	Val	Leu	Val	Ile	Lys	Gln	Gly
			20					25					30		
Ile	Lys	Arg	Glu	Gly	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser
		35					40					45			
Asp	Val	Phe	Leu	Phe	Ile	Ala	Gly	Thr	Leu	Gly	Val	Asp	Leu	Leu	Ser
	50					55					60				
Asn	Ala	Ala	Pro	Ile	Val	Leu	Asp	Ile	Met	Arg	Trp	Gly	Gly	Ile	Ala
65				70					75					80	
Tyr	Leu	Leu	Trp	Phe	Ala	Val	Met	Ala	Ala	Lys	Asp	Ala	Met	Thr	Asn
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Ala	Pro	Gln	Ile	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu	Pro	Thr	Val	Pro
		100						105					110		
Asp	Asp	Thr	Pro	Leu	Gly	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	His				
		115						120							

<210> 25

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 25

tgacctgcag gtttgcacag aggatggccc atgtt

35

<210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 26

cattctagat ccctaaactt tacagcaaac cggcat

36

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 メタノール資化菌、特にメチロフィラス属細菌のリジンデカルボキシラーゼ遺伝子とそれを用いたL-リジン製造法を提供する。

【解決手段】 下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNAと同一の塩基配列を有する遺伝子、又は同DNAと相同組換えが起こり得る程度の相同性を有する遺伝子が破壊されたことにより、該遺伝子の発現が抑えられ、細胞中のリジンデカルボキシラーゼ活性が低下または消失したメチロフィラス属細菌を、メタノールを主要炭素源とする液体培地に培養し、培養物中にL-リジンを生成蓄積させ、該培養物からL-リジンを採取する。

(A) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、リジンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【選択図】 なし

特願 2003-047185

出願人履歴情報

識別番号

[000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号
氏 名 味の素株式会社
2. 変更年月日 2003年 5月12日
[変更理由] 名称変更
住所変更
住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号
氏 名 味の素株式会社